

Univerzita Karlova

Lékařská fakulta v Plzni

Dizertační práce

Plzeň 2019

Jan Horák

Univerzita Karlova

Lékařská fakulta v Plzni

Studijní program: Vnitřní lékařství

Sepsa a akutní poškození ledvin

Molekulární mechanizmy a nové léčebné aspekty

Sepsis and sepsis-associated acute kidney injury

Molecular mechanisms and novel aspects of treatment

Dizertační práce

Školitel: prof. MUDr. Martin Matějovič, Ph.D.

Plzeň, 2019

MUDr. Bc. Jan Horák

ABSTRAKT

Sepse je nejčastější příčinou úmrtí na jednotkách intenzivní péče celosvětově. Navzdory nezpochybnitelnému pokroku na poli preklinického i klinického výzkumu dosud neexistuje efektivní kauzální léčba. S ohledem na komplexnost a heterogenitu odpovědi hostitelského organismu na přítomnost infekce je snaha o využití léčebných strategií, které mají potenciál postihnout tyto mechanismy na více úrovních. Buněčná terapie s využitím mezenchymálních kmenových buněk představuje výzkumný směr, který přinesl pozitivní výsledky v řadě studií s malým zvířecím modelem sepse. Dosud však nebyl testován vliv kmenových buněk na průběh sepse u klinicky relevantního modelu. Experimentálnímu ověření bezpečnosti a účinnosti intravenózní aplikace kmenových buněk je věnována část textu. Další z potenciálně efektivních strategií je ovlivnění neuroinflamatorního reflexu prostřednictvím stimulace bloudivého nervu; zhodnocení účinnosti vagové stimulace se zabývá zbývající část práce.

KLÍČOVÁ SLOVA

Sepse, akutní poškození ledvin, mezenchymální kmenové buňky, vagová stimulace

ABSTRACT

Sepsis is the most common cause of death in the intensive care units worldwide. Despite the undeniable progress in pre- and clinical research, the effective causal therapeutic strategy still does not exist. Given to extremely complex and heterogenic host response to presence of infection, the paradigm „one disease, one drug“ is obviously flawed and combination of multiple targets that involves early immunomodulation and cellular protection are needed. Cellular therapy using mesenchymal stem cells represents strategy that brought positive results in experiments with rodent septic models. Part of this thesis is dedicated to evaluation of safety and efficacy of stem cells intravenous administration to well-established large animal model of progressive peritoneal sepsis. Affecting of the neuroinflammatory reflex through the vagus nerve stimulation showed potential to attenuate sepsis in rodents. Rest of the text is dedicated to evaluation of vagus nerve stimulation effectivity in our model.

KEYWORDS

Sepsis, sepsis-associated acute kidney injury, mesenchymal stem cells, vagus nerve stimulation

Prohlašuji, že tuto dizertační práci jsem vypracoval samostatně. Veškerou literaturu a ostatní prameny, z nichž jsem při přípravě čerpal, řádně cituji a dále uvádím v seznamu literatury. Současně souhlasím se zapůjčováním této práce.

Jméno:

Datum:

Podpis:

PŘEHLED POUŽITÝCH ZKRATEK

AKI	akutní poškození ledvin
CCI	chronické kritické onemocnění
CLP	punkce a ligace céka
CO	srdeční výdej
CVP	centrální žilní tlak
DAMPs	damage associated molecular patterns
DO ₂	delivery of oxygen
ER	extrakční koeficient
IL-6	interleukin 6
IL-8	interleukin 8
IL-10	interleukin 10
LPS	lipopolysacharid
MAP	střední arteriální tlak
MDSC	myeloidní supresorové buňky
MPAP	střední tlak v plicnici
MSC	mezenchymální kmenové buňky
NF-κB	nukleární faktor κB
PAMPs	pathogen associated molecular patterns
PAWP	tlak v zaklínění
PICS	syndrom perzistující inflamace, imunosuprese a katabolizmu
Q _{ren}	průtok krve renální arterií
ROS	reactive oxygen species
SA-AKI	septické akutní poškození ledvin
SIRS	syndrom systémové zánětlivé odpovědi
SOFA	sequential organ failure assessment skóre
TLRs	toll-like receptory
VO ₂	maximal oxygen consumption

OBSAH

1. Úvod	1
2. Původní práce	3
3. Současný stav problematiky	4
3.1. Patofyziologie sepse	5
3.2. Seps jako „chronické“ kritické onemocnění	6
3.3. Patofyziologie SA-AKI	7
3.4. Experimentální léčebné strategie sepse a SA-AKI.....	11
4. Cíle původních vědeckých prací.....	16
5. Metodické aspekty práce.....	17
5.1. Legální aspekty práce s experimentálním zvířecím modelem	17
5.2. Experimentální model progresivní peritoneální sepse	17
5.3. Experimentální intervence.....	21
6. Souhrn výsledků experimentálních prací a diskuze.....	22
7. Práce bezprostředně navazující na náš výzkum.....	27
8. Závěr.....	28
9. Podpora	29
10. Poděkování.....	30
11. Seznam použité literatury	31
12. Přílohy	36

1. ÚVOD

Sepse je bezpochyby jednou z největších medicínských hrozeb pro 21. století. Současná definice označována jako SEPSIS-3 vychází z recentních poznatků patofyziologických mechanismů, jež vytvářejí komplexní obraz život ohrožujícího syndromu orgánové dysfunkce vznikajícího na podkladě deregulované odpovědi hostitelského organismu na přítomnost infekce. U septického šoku jsou vyjádřeny abnormality cirkulačních, metabolických a celulárních procesů natolik, že dojde k významnému vzestupu mortality; ta dosahuje u septického šoku více než 40 %. Diagnóza septického šoku se opírá o potřebu užití vazopresoru k udržení středního arteriálního tlaku nad 65 mmHg a současnou elevaci sérových hladin laktátu nad 2 mmol/l (Singer, 2016). SEPSIS-3 definice tak vystřídala koncept kritérií syndromu systémové zánětlivé odpovědi (SIRS) spolu s potvrzenou či předpokládanou přítomností infekce. Minulostí je také již pojem těžké sepse, kdy byla v rámci sepse vyjádřena jedna či více poruch orgánových funkcí. Seps je nejčastější příčinou úmrtí na nekoronárních jednotkách intenzivní péče celosvětově. Každoročně postihne seps 30 milionů pacientů, z nichž více než 25 % zemře. Pacient přijatý s diagnózou sepse má 6 – 10x vyšší riziko úmrtí než pacient s akutním infarktem myokardu a 4 – 5x vyšší než pokud by byl přijatý pro cévní mozkovou příhodu (Liu, 2014). U populace pacientů nad 65 let věku jsou infekční příčiny častějším důvodem hospitalizace než srdeční selhání a infarkt myokardu dohromady (Goto, 2016). Finanční náklady, které každé zdravotnictví vynakládá na léčbu sepse během hospitalizace, jsou enormní, dosahující 5,2 % celkových výdajů ve zdravotnictví ekonomicky vyspělých zemí; v roce 2006 činily finanční náklady spojené s hospitalizací septických pacientů 7,6 miliardy Eur. Vzhledem k těmto alarmujícím číslům není překvapivé, že v květnu roku 2017 prohlásila Světová zdravotnická organizace sepsi celosvětovou zdravotní prioritou a přijala usnesení ke zlepšení její prevence, diagnostiky a léčby.

Diagnostika sepse se opírá o dva pilíře – přítomnost infekce a nově vzniklou poruchu funkce jednoho či více orgánů nebo progresi jejich chronické dysfunkce dle SOFA (sequential-organ failure assessment / sepsis-related organ failure assessment) skóre, jež hodnotí škálou 0 – 4 bodů celkem šest orgánových systémů (oxygenační index PaO_2/FiO_2 , renální katabolity, sérový bilirubin, trombocytémie, Glasgow coma scale a parametry makrocirkulace); k diagnóze sepse je potřeba dosažení 2 a více bodů (Singer, 2016). Mortalita septických pacientů strmě narůstá s výší SOFA skóre a počtem postižených orgánových systémů (Vincent, 2006). Ve většině případů se v poměrně

časných fázích sepsy a multiorgánové dysfunkce rozvíjí akutní poškození ledvin (AKI). AKI je souborem syndromů, jejichž společným jmenovatelem je pokles glomerulární filtrace (Kellum, 2012) a právě sepsy je nejčastější příčinou vzniku a rozvoje AKI; až 51 % septických pacientů vyvine určité poškození funkce ledvin, které je v sepsi asociováno s 41 % mortalitou (Vincent, 2006). Akutní poškození ledvin v sepsi (SA-AKI) představuje nezávislý rizikový faktor úmrtí, který významně ovlivňuje nejen krátkodobou, ale i dlouhodobou prognózu pacientů (Kellum, 2018), a to zejména těch, jejichž stav si v průběhu onemocnění vyžádá náhradu funkce ledvin (Triverio, 2009).

Navzdory nezpochybnitelnému pokroku v oblasti preklinického a klinického výzkumu patofyziologických mechanismů a nových léčebných strategií v sepsi dosud neexistuje efektivní kauzální léčba. Management nemocných se opírá o včasné zahájení antibiotické léčby případně o sanaci infekčního fokusu a dále pak o podporu orgánových funkcí. Vývoj kauzální terapie vyžaduje nezbytně dokonalou znalost procesů, které stojí za vlastním klinickým obrazem sepsy. Přímá extrakce těchto informací vázne v humánní medicíně na etických aspektech klinického výzkumu. Proto zůstávají primárním zdrojem poznatků základního výzkumu experimentální zvířecí modely. V rámci níže uvedených experimentálních projektů byl využit etablovaný velký zvířecí model (prase), u něž byla indukována polymikrobiální sterkorální peritonitida, a který posléze umožnil testování nových léčebných strategií, jež v minulosti přinesly pozitivní výsledky při preklinických experimentech s malými septickými zvířecími modely.

Dizertační práce předkládá komentovaný výstup k dříve publikovaným výsledkům, jež vycházejí z experimentálních prací s výše uvedeným modelem progresivní peritoneální sepsy. První část v přehledu zpracovává aktuální stav poznání týkající se patofyziologie sepsy a SA-AKI, dále je věnována metodologii výzkumu, popisu a protokolu práce s modelem. Druhá část se pak zabývá problematikou nově testovaných léčebných postupů, zejména analýze bezpečnosti a efektivity aplikace mezenchymálních kmenových buněk a také vagové stimulaci jakožto možné potenciálně efektivní léčebné modality.

2. PŮVODNÍ PRÁCE

- (I) HORÁK, Jan, HRAZIM, Martin, KARVUNIDIS, Thomas, RADĚJ, Jaroslav, NOVÁK, Ivan, MATĚJOVIČ, Martin. Sepsis – jak ji poznat, na co se zaměřit aneb zpět k základům ve světle nové definice. *Vnitřní lékařství*. 2016; **62**(7-8), 568-574.
- (II) HORÁK, Jan, MATĚJOVIČ, Martin. Experimentální pokroky v léčbě sepsis. IN: GURLICH, Robert a kol., Peritonitis. 1. vydání. Praha: Maxdorf. 2019, s. 129-139. ISBN 978-80-7345-584-2
- (III) HORÁK, Jan, NALOS, Lukáš, MARTÍNKOVÁ, Vendula, BENEŠ, Jan, ŠTENGL, Milan, MATĚJOVIČ, Martin. Mesenchymal Stem Cells in Sepsis and Associated Organ Dysfunction: A Promising Future or Blind Alley? *Stem Cells International*. 2017. **(IF 3,54)**
- (IV) HORÁK, Jan, NALOS, Lukáš, MARTÍNKOVÁ, Vendula, TÉGL, Václav, VIŠTEJNOVÁ, Lucie, KUNCOVÁ, Jitka, KOHOUTOVÁ, Michaela, JARKOVSKÁ, Dagmar, BENEŠ, Jan, ŠTENGL, Milan, MATĚJOVIČ, Martin. Evaluation of mesenchymal stem cell therapy for sepsis: a randomized controlled porcine study. *Frontiers Immunology* **(IF 4,716) under review**
- (V) KOHOUTOVÁ, Michaela, HORÁK, Jan, JARKOVSKÁ, Dagmar, MARTÍNKOVÁ, Vendula, TÉGL, Václav, NALOS, Lukáš, VIŠTEJNOVÁ, Lucie, BENEŠ, Jan, ŠVÍGLEROVÁ, Jitka, KUNCOVÁ, Jitka, MATĚJOVIČ, Martin, ŠTENG, Milan. Vagus Nerve Stimulation Attenuates Multiple Organ Dysfunction in Resuscitated Porcine Progressive Sepsis. *Critical Care Medicine*. 2019; 47(6), 461-469. **(IF 6,971)**
- (VI) JARKOVSKÁ, Dagmar, MARKOVÁ, Michaela, HORÁK, Jan, NALOS, Lukáš, BENEŠ, Jan, AL-OBEIDALLAH, Mahmoud, TŮMA, Zdeněk, ŠVÍGLEROVÁ, Jitka, KUNCOVÁ, Jitka, MATĚJOVIČ, Martin, ŠTENGL, Milan. Cellular Mechanisms of Myocardial Depression in Porcine Septic Shock. *Frontiers in Physiology*. 2018; 726(9). **(IF 3,476)**

3. SOUČASNÝ STAV PROBLEMATIKY

3.1. Patofyziologie sepse

Reakce organismu na přítomnost infekce je interindividuálně značně odlišná a vychází z genetické výbavy jedince. V úvodní fázi bakteriální infekce dochází k alteraci exprese více než 3700 genů (Calvano, 2005), které regulují imunitní a metabolické mechanismy a ovlivňují řadu fyziologických funkcí včetně odpovědi akutní fáze inflamace, oxidačního stresu, mezibuněčné signalizace a energetického metabolismu. Akutní fáze se velice vhodně označuje jako genomická či cytokinová bouře. Dominantní postavení v úvodní fázi hostitelské odpovědi má vrozený imunitní systém a jeho schopnost detekovat tzv. alarminy, tj. s patogenem spojené molekulární motivy (pathogen-associated molecular patterns, PAMPs; především komponenty stěny gramnegativních a grampozitivních bakterií a jiných patogenů – endotoxin či beta-glukan aj.) a také s poškozením spojené molekulární motivy (damage-associated molecular patterns, DAMPs; mitochondriální DNA, adenosintrifosfát, heat shock proteiny, high mobility group box 1 aj.). Přítomnost těchto molekul je rozpoznána motivy rozeznávajícími receptory (pattern recognition receptors, PRRs) na povrchu buněk vrozeného imunitního systému (zejm. toll-like receptors, TLRs), dále na povrchu některých typů epiteliálních buněk či receptory v cytosolu. Dobře popsáním mechanismem molekulárního rozpoznání je reakce na lipopolysacharid (LPS) stěny gramnegativních bakterií. Ten vytváří komplex s cirkulujícím lipopolysacharid-vážečím proteinem (LBP), kdy tento komplex aktivuje TLR-4 receptor na povrchu antigen prezentujících buněk (nejčastěji makrofágů). Interakcí těchto faktorů dochází cestou adaptorové molekuly (MyD88) k upregulaci aktivity nukleárního faktoru κ B (NF- κ B), který je potentním mediátorem produkce prozánětlivých cytokinů - jako např. interleukin-1, interleukin-6 či tumor necrosis factor alfa. Obdobným, ne však dosud detailně objasněným mechanismem, působícím cestou TLR-2 receptorů, spouští produkci prozánětlivých cytokinů i interakce s grampozitivními bakteriemi. Některé PRRs (zejm. NOD-like, či RIG-I-like receptory) pak mají schopnost vytvářet komplexy (= inflamazomy), které jsou mimo jiné potentními spouštěči programované buněčné smrti cestou aktivace kaspáz. Zvýšená exprese prozánětlivých cytokinů vede ke zvýšení počtu, životnosti a míry aktivace imunokompetentních buněk, dále vede k aktivaci endoteliálních buněk a zvýšení exprese ostatních chemokinů; parakrinní sekrece antimikrobiálních substancí, prooxidativních faktorů a prokoagulačních proteinů a lipidů

aktivovanými elementy (neutrofily, trombocyty aj.) vede mimo jiné ke vzniku tzv. imunotrombózy, tedy tvorbě mikrotrombů, v nichž je „uvězněno“ a likvidováno mikrobiální agens (Gotts, 2016).

Inflamatorní odpověď, pokud je izolována a regulována, vede k rychlé eliminaci malé a lokalizované infekce. Avšak v případě, překročí-li interindividuálně odlišné hranice tolerance a možnosti regulace, rozvíjí se systémové poškození, které vyústí v klinický obraz sepse. Nadměrná a nekontrolovaná tvorba reaktivních forem kyslíku a dusíku (reactive oxygen/nitrogen species, ROS/NOS) v průběhu imunitních procesů, může vést k poškození buněčných proteinů a lipidů a mít za následek poškození buněčných funkcí (Singer, 2014). Produkci ROS a NOS pak dále potencuje aktivace komplementu (zejména C5a). Tvorba rozsáhlé imunotrombózy může vyústit v diseminovanou intravaskulární koagulaci (DIC) s postižením mikrovaskulárních funkcí a vést tak v další tkáňové a orgánové poškození (Pool, 2018). Specifikem sepse je deregulovaná odpověď, kterou dále posilují a zacyklují DAMPs uvolňované z poškozených buněk, jež disponují stejnou schopností vyvolat deregulovanou odpověď. Buněčné a tkáňové poškození je dále potencováno vznikem a rozvojem metabolické dysfunkce. Vysoká míra oxidačního/nitrosativního stresu spolu s nadprodukcí cytokinů a nerovnováhou mezi genezí a odstraňováním dysfunkčních mitochondrií vede k poškození těchto organel (Singer, 2017, Pool, 2018). Důsledkem této poruchy je pokles intracelulární koncentrace ATP s následným útlumem buněčných funkcí a stavem podobný hibernaci (Singer, 2017). Dochází tak ke generalizovanému poklesu tkáňového energetického výdeje a alteraci buněčných, respektive tkáňových a orgánových funkcí; rozvíjí se či prohlubuje akutní poškození funkce ledvin, jater, deprese funkce myokardu, syndrom akutní respirační tísně (ARDS), encefalopatie či dysfunkce gastrointestinálního traktu (Deutschmann, 2014).

Již v úvodních hodinách akutní fáze dochází k aktivaci kompenzatorní anti-inflamatorní odpovědi. Stimulované imunokompetentní buňky produkují řadu protizánětlivých cytokinů jako zejm. interleukin-10, který vede k potlačení produkce IL-6, dále podporuje tvorbu antagonistů interleukin-1 receptorů a TNF α receptorů, čímž brání signalizaci prostřednictvím těchto molekul (Schulte, 2013). Paralelně s tím dochází k aktivaci mechanismů autofagie s cílem eliminace PAMPs a DAMPs prostřednictvím lyzozomální degradace a deaktivace inflamazomů (Gotts, 2016). Relativně recentní popis mechanismů rezoluce zánětu jako aktivního procesu, nikoliv dříve chápaného pasivního ústupu proinflamatorních procesů, vedl k popisu nových bioaktivních a signálních molekul

jako jsou lipoxiny, resolviny, protektiny a maresiny, jejichž význam spočívá v redukcí míry ROS/NOS a imunomodulačních pochodech s cílem restituce homeostázy a imunitních funkcí (Gotts, 2016).

3.2. Sepse jako „chronické“ kritické onemocnění

Díky včasné diagnostice a včasnému zahájení léčby v podmínkách intenzivní péče dnes přežívá velká část pacientů svůj úvodní septický inzult. Přibližně polovina z nich časně obnoví fyziologickou homeostázu, nicméně zbývající část nemocných se zotavuje velice pozvolna a průběh jejich onemocnění je zatížen protražovaným pobytem na JIP a významnou mortalitou. Tento stav charakteristický potřebou komplexní intenzivní péče, náhrady orgánových dysfunkcí, katabolismem a malnutricí, imunosupresí s četnými infekčními komplikacemi trvající déle než 7 dní, kdy mnozí nemocní již nikdy nezískají funkční nezávislost, se arbitrárně označuje jako chronické kritické onemocnění (CCI, chronic critical illness; Lamas, 2014). Relativně nedávno byl popsán syndrom charakteristický perzistencí inflamace, imunosuprese a katabolizmu (persistent inflammation-immunosuppression and catabolism syndrome, PICS) jako patobiologický korelát, který je kombinací pro-inflamatorního a imunosupresivního fenotypu CCI (Gentile, 2012). Nemocní s CCI mají obvykle laboratorní známky perzistující inflamace s elevací proteinů akutní fáze a prozánětlivých interleukinů (IL-6 a IL-8) s buněčnou expanzí myeloidních supresorových buněk (MDSC), dále jeví známky imunosuprese současně s reaktivací latentních virových infekcí a současně trpí progresivním katabolismem s rozvojem kachexie a sarkopenie (Hawkins, 2018). Mediátory perzistující inflamace jsou alarminy – 1) exogenní PAMPs při recidivujících nozokomiálních infekcích a reaktivaci latentních virových infekcí a 2) DAMPs při konstantním uvolňování z poškozených buněk, tkání a orgánů a také z aktivovaných imunokompetentních buněk. Nemocní v sepsi a přeživší mají významně elevovány sérové hladiny jaderné DNA, HMGB1 a S100 proteinu, které působí jako potentní endogenní alarminy. Neverifikovanou hypotézou zatím zůstává identifikace primárních zdrojů alarminů v AKI a progresivním muskulárním katabolizmu (Hawkins, 2018). V akutní fázi septického inzultu dochází vlivem cytokinové a adrenergní stimulace k aktivaci emergentní myelopoese s uvolňováním zralých i nezralých forem neutrofilních granulocytů a tento proces je v případě časně regrese tlumen antiinflamatorní reakcí. V případě CCI, kdy jsou alarminy uvolňovány neustále, dochází k posunu fenotypu produkovaných myeloidních buněk

směrem k posílení imunosupresivních vlastností (Brudecki, 2012). MDSCs mají spolu s imunosupresivními schopnostmi (cestou produkce IL-10 a inhibice proliferace a responze CD4⁺ a CD8⁺ T-lymfocytů) zachovanou schopnost produkce prozánětlivých cytokinů, realizace oxidativních procesů s tvorbou ROS/NOS, čímž dále potencují buněčné a tkáňové poškození a tím udržují proinflamatorní stav a současně navozují imunosupresi (Loftus, 2018). Zvýšená koncentrace MDSC u nemocných s CCI je silným nezávislým prediktivním faktorem vzniku nozokomiálních infekcí a nepříznivého průběhu onemocnění (Hawkins, 2018).

3.3. Patofyziologie SA-AKI

Navzdory tomu, že jsou ledviny nejčastěji selhávajícím orgánem u kriticky nemocných septických pacientů a jejich dysfunkce je nezávislým rizikovým faktorem významně zvyšujícím riziko úmrtí (Kellum, 2018), není dosud patofyziologie SA-AKI plně rozklíčována. Vzájemný vztah SA-AKI a sepse je oboustranný – nejen, že sepsa je zdaleka nejčastější příčinou AKI, nemocní s AKI také snáze rozvinou sepsi a současně perzistující AKI má schopnost potencovat patobiologické mechanismy PICS/CCI (Matějovič, 2011). Při vzniku a progresi SA-AKI se uplatňuje řada mechanismů, které zahrnují alteraci cirkulace na makro- i mikro- úrovni, inflamaci, oxidativní/nitrosativní stres a změny celulárního energetického metabolismu; tyto mechanismy jsou odrazem kaskády dějů probíhající v organismu v průběhu sepse. Informace týkající se těchto patofyziologických procesů jsou získávány primárně z experimentálních prací s klinicky relevantními, do určité míry omezenými zvířecími modely.

V úvodních fázích sepse je hypovolémie mnohdy dominujícím faktorem podílejícím se na rozvoji AKI. Její korekci lze zvrátit nepříznivý vývoj renálního poškození, který by v opačném případě neodvratně vedl k rozvoji ischemické akutní tubulární nekrózy (ATN). Hemodynamická alterace je u postupující sepse charakteristická poklesem systémové vaskulární rezistence s rozvojem hypotenze nereagující na volumexpanzi, která, spolu se změnami na úrovni mikrocirkulace (zejména poklesem hustoty funkční kapilární sítě) a heterogenní distribucí renálního krevního průtoku (RBF) (De Backer, 2002), vede k rychlému poklesu glomerulární filtrace. U řady septických nemocných však dochází, navzdory adekvátní a včasné korekci hemodynamické poruchy, ke snížení funkce ledvin a někteří nemocní rozvinou poruchu funkce ledvin i přes absenci hypovolémie či cirkulační poruchy (Matějovič, 2015). Za dominantní mechanismus AKI u

populace kriticky nemocných je tradičně považována právě ATN, která odráží cirkulační abnormality v sepsi. Post-mortem prováděné histologické analýzy vzorků ledvin septických nemocných se SA-AKI však opakovaně prokázaly významně nižší výskyt ATN (5 – 22 %), než byl pozorován u jiných kriticky nemocných, což poukazuje na mnohem menší podíl hypoperfúze v patofyziologii SA-AKI. Současně pak opakovaně ozřejmily nespecifické heterogenní změny na úrovni tubulárního epitelu; dominujícím nálezem u vyšetření ledvin septických zvířecích modelů byla přítomnost apoptózy tubulárních buněk (Garofalo, 2019).

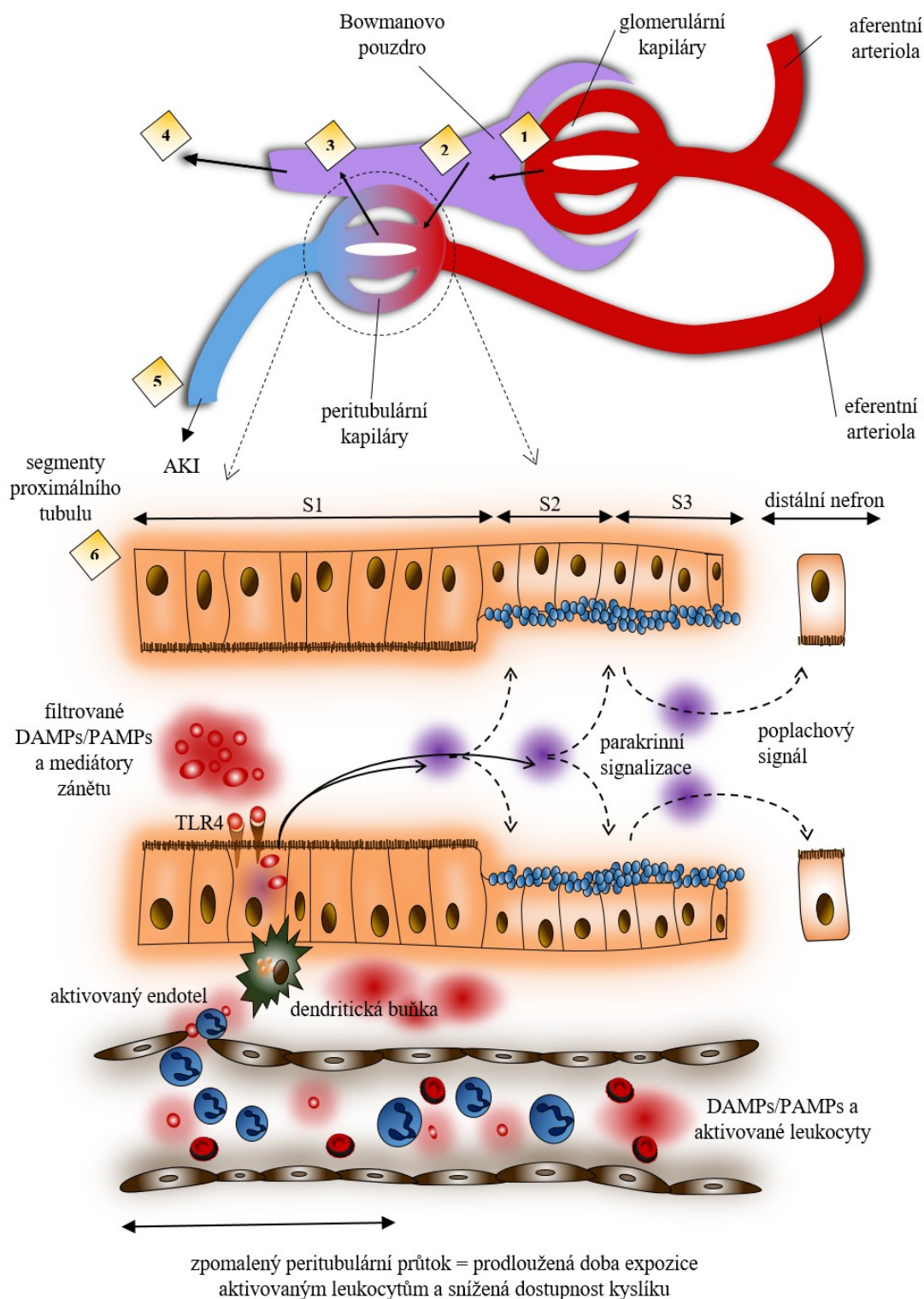
Dysfunkce renální mikrocirkulace je v současnosti považována za časný a pro rozvoj a vznik AKI zásadní mechanismus. Alterace mikrocirkulace nezahrnuje však pouze hemodynamickou složku; na rozvoji této dysfunkce se podílí i leukocytární infiltrace, poškození glykokalyxu, mikrovaskulární trombóza glomerulů a aktivace koagulační kaskády s následnou tvorbou depozit fibrinu peritubulárně (Kellum, 2011, Guerci, 2017). Heterogenní distribuce RBF má za následek vznik oblastí hypoperfúze a hypoxie a to dominantně v renálním kortexu. Tato místa pak mohou další produkci DAMPs přispívat v procesu inflamace (Gomez, 2015). V oblastech s kompenzatorní hyperperfúzí může dojít k otevření periglomerulárních zkratů cestou Ludwigových artérií (spoj vas afferens a vas efferens) vedoucích k bypassu krevního průtoku glomerulů a dalšímu k poklesu glomerulární filtrace (Martensson, 2015).

Epitel tubulů také poměrně snadno podléhá poškození vlivem oxidativního stresu. DAMPs uvolňované z poškozených buněk mohou dále potencovat patofyziologické mechanismy cestou aktivace TLR receptorů (1 - 6), které jsou ve zvýšené míře exprimovány na povrchu tubulárních buněk a jejich progresivní upregulace vede ke zvýšené reaktivitě ledviny (Allam, 2012, Zager, 2006). Inflamace a oxidativní stres spouští mechanismy vedoucí k metabolické alteraci a mitochondriální dysfunkci, jež se nadále podílejí na rozvoji a progresi SA-AKI (Singer, 2017). Schéma patofyziologie AKI v sepsi představuje **Obrázek č. 1**.

Není dosud plně objasněno, z jakého důvodu jsou právě ledviny nejčastěji postiženým orgánem u kriticky nemocných. Za fyziologických podmínek přefiltrují ledviny za den cca 180 l tekutiny, což je cca 30 násobek objemu intravaskulární tekutiny; v kontextu hyperdynamické septické cirkulace může být teoreticky toto množství ještě výrazně vyšší, z čehož vyplývá, že imunokompetentní buňky renálního parenchymu jsou

mnohonásobně častěji vystaveny PAMPs, DAMPs či jiným reaktantům než některé jiné tkáně.

Perzistující AKI se také v poslední době ukazuje jako jeden z potenciálních hnacích mechanismů PICS/CCI. Chemokiny produkované renálním parenchymem a hojně zastoupenými imunokompetentními buňkami v odpovědi na přítomnost alarminů potencují nejen lokální poškození, ale mohou mít i systémový efekt (Hassoun, 2007). Nemocní s AKI mají konstantně elevovány sérové hladiny IL-8, CXC ligandu 1, MCP-1 (monocyte chemoattractant protein 1) a MIP-1 β proteinu (macrophage inflammatory protein 1 β); tyto působky jsou asociovány mimo jiné také se sekundárním poškozením plicního parenchymu (Hoke, 2007).



Obrázek č. 1 – Patofyziologie SA-AKI (adaptováno z Matějovič, 2015 se svolením autora).

1 – filtrát obsahující PAMPs/DAMPs, 2 – tubulární trauma indukuje lokální vaskulární poruchy, 3 – sepsí vyvolané poruchy peritubulární mikrocirkulace + zóny lokální ischemie, 4 – důsledkem je rozvoj manifestního AKI, 5 – renální žilní kongesce, 6 – epiteliálně endoteliální interakce s propagací tkáňového poškození

3.4. Experimentální léčebné strategie sepse a SA-AKI

Experimentální léčebné strategie cílené na ovlivnění patofyziologických mechanismů sepse a s ní spojených orgánových dysfunkcí jsou v současné době středobodem zájmu preklinického a částečně i klinického výzkumu na poli intenzivní medicíny. Stručný přehled doplněný o poznatky z recentně publikovaných prací předkládá níže uvedený text.

(II) HORÁK, Jan, MATĚJOVIČ, Martin. Experimentální pokroky v léčbě sepse. IN: GURLICH, Robert a kol., Peritonitis. 1. vydání. Praha: Maxdorf. 2019, s. 129-139. ISBN 978-80-7345-584-2

Současná zaměření experimentálních léčebných strategií sepse lze rozdělit do několika kategorií:

- 1) Neutralizace bakteriální virulence
- 2) Inhibice inflamatorního signálu
- 3) Mimotělní eliminace mediátorů sepse
- 4) Prevence a léčba sepsí navozené imunosuprese
- 5) Buněčná a mitochondriální resuscitace

Strategie cílená na neutralizaci bakteriální virulence je postavena primárně na extrakorporální adsorpci PAMPs, z nichž dominantní roli hraje již zmíněný lipopolysacharid (LPS). Recentní snahy o neutralizaci LPS s využitím hemadsorpčních materiálů s polymyxinem B, antibiotikem s vysokou afinitou k LPS, nepřinesly kýžené výsledky v podobě redukce mortality septických nemocných. Další z cest představuje farmakologická neutralizace bakteriální virulence. Alkalická fosfatáza (ALP) je enzymem ze skupiny ektonukleáz se schopností defosforylovat, a tím neutralizovat, toxické účinky LPS. Cílem nedávné multicentrické studie STOP-AKI bylo zhodnocení bezpečnosti, tolerance a efektivity intravenózně podávané ALP u septických nemocných; tato studie však neprokázala příznivý vliv na zlepšení funkce ledvin v sepsi v krátkodobém časovém horizontu (Pickkers, 2018).

Inhibice inflamatorního signálu je strategií, která cílí na blokádu PRRs. V minulosti byly testovány mnohé farmakologické agens cílené na inhibici signálu cestou TLR-4, kdy však žádné z nich nemělo signifikantní vliv na přežití nemocných. Dosud detailněji

neprozkoumanou oblastí zůstává možnost inhibice signálů DAMPs, ovlivnění složek komplementu či mezibuněčné komunikace na úrovni imunitního systému.

Extrakorporální eliminace mediátorů sepse je léčebnou strategií, jejímž působením dochází k neselektivnímu a neregulovanému odstraňování nejen faktorů, které ovlivňují průběh sepse, ale i látek, které jsou nezbytné pro účinný boj s infekčním agens vč. některých antibiotik. Žádná dosud publikovaná data, týkající se užití hemoelminačních metod v sepsi a septickém šoku dosud neprokázala příznivý efekt na mortalitu nemocných; experimentální práce popisují pouze dílčí efekt na časnější dosažení hemodynamické stabilizace či zlepšení reaktivity na podávané katecholaminy. Mnohem menší množství informací týkajících se bezpečnosti a efektivity je dostupné u metod hemadsorpčních. Navzdory absenci těchto dat si některé z těchto systémů našly cestu do klinické praxe. Jejich využití však dosud není podpořeno robustními výsledky v podobě řádně provedených randomizovaných studií ani relevantních preklinických experimentů.

V rámci CCI selhává schopnost imunitního systému odhalit a eradikovat infekční, zejména nozokomiální či reaktivované latentní, agens. Imunoterapeutický přístup je moderní strategií v léčbě těchto stavů nepochybně s velkým potenciálem. Mezi hlavní cíle patří inhibice apoptózy, blok negativních kostimulačních molekul, zvýšení HLA-DR exprese a „restart“ vyčerpaných či anergních T-lymfocytů. Příslibem do budoucna jsou i tzv. check-point inhibitory, jejichž efekt byl již úspěšně testován, zejména u onkologických nemocných.

S ohledem na komplexnost a heterogenitu odpovědi organismu na přítomnosti infekce je značně nepravděpodobné, že bude vyvinut nějaký „anti-sepsis“ lék, který by byl schopen zvrátit patofyziologické procesy sepse. Kauzální management bude vyžadovat zásah do procesů na více úrovních a současně bude nezbytná individualizace léčby s ohledem na endotyp nemocného. Právě heterogenita sepse, ať v experimentálních pracích, tak v klinických studiích, je zdrojem negativních výsledků u strategií, které se v úvodu jeví jako potenciálně prospěšné. Tendence současné experimentální intenzivní medicíny směřují k vývoji léčebných strategií, které umožní časný a komplexní zásah do patofyziologických procesů akutní fáze sepse, který bude zahrnovat imunomodulaci a buněčnou protekci. V současné době existuje pouze omezené množství postupů, které mají potenciál tato kritéria naplnit.

Mezenchymální kmenové buňky v sepsi

Buněčná imunomodulační terapie s využitím mezenchymálních kmenových buněk (MSCs) představuje léčebnou strategii, jež má potenciál zacílit na patofyziologické procesy sepse víceúrovňově. MSCs jsou multipotentní kmenové buňky se schopností diferenciací v tkáň všech tří zárodečných listů, primárně pak v tkáň mezenchymové. V inflamatorním prostředí *in vitro* či u malých zvířecích modelů však vystupují do popředí některé jejich jiné vlastnosti. Mají schopnost zpětnovazebně, prostřednictvím stimulované parakrinní sekrece řady působků, modifikovat imunitní procesy ve smyslu útlumu a regulace intenzity pro-inflamatorní odpovědi. Látky secernované MSCs dále snižují úroveň oxidativního stresu a inhibují procesy vedoucí k apoptóze buněk. Se svou schopností transferu vezikul s bioaktivními látkami a dále některých organel, jako např. mitochondrií, cestou nanotubulů, mohou obnovovat funkce poškozených či utlumených buněk. V přítomnosti bakteriálního agens jsou schopny produkovat látky, které přímo inhibují bakteriální růst. Není proto divu, že se MSCs staly jednou z cest, kterými se ubírá preklinický výzkum léčby sepse. Pozitivní vliv MSCs na průběh sepse, v procesu prevence orgánové dysfunkce a redukce intenzity zánětlivé odpovědi byl v nedávné době opakovaně verifikován v experimentálních pracích s malými zvířecími modely sepse. Problematiku fyziologie MSCs a jejich vliv na průběh sepse u malých zvířecích modelů souhrnně předkládá přehledový článek:

(III) HORÁK, Jan, NALOS, Lukáš, MARTÍNKOVÁ, Vendula, BENEŠ, Jan, ŠTENGL, Milan, MATĚJOVIČ, Martin. Mesenchymal Stem Cells in Sepsis and Associated Organ Dysfunction: A Promising Future or Blind Alley? *Stem Cells International*. 2017. (IF 3,54)

V době publikace nebyly dostupné žádné experimentální práce týkající se bezpečnosti aplikace a efektivity MSCs u klinicky relevantních zvířecích modelů ani v lidské sepsi. Navzdory tomuto faktu byly současně registrovány a již probíhaly některé klinické studie, jejichž cílem bylo zhodnotit podávání MSCs jako adjuvantní léčby v septickém šoku a v asociovaných orgánových dysfunkcích. S ohledem na nepochybně vynechaný krok v translaci poznatků získaných v experimentech s malým zvířecím modelem směrem k humánní medicíně a v kontextu narůstajících investic do buněčných terapií (Snyder, 2018, Snyder 2019) nikoliv dostatečně podložených principy medicíny založené na důkazech, přesto tak prezentovaných, vyvstala potřeba evaluace bezpečnosti a

efektivitu MSCs na velkém zvířecím modelu sepse, jehož pato/fyziologické procesy mnohem blíže napodobují mechanismy sepse u člověka, než je tomu u zvířecích modelů, jako jsou myši či jiní hlodavci.

Velmi recentně byly publikovány výsledky pilotních experimentů z klinické studie (CISS, No. NCT02421484), jejímž cílem byla analýza bezpečnosti a efektivity aplikace předem stanovených dávek MSCs (0,3 – 1,0 – 3,0 mil/kg) nemocným v septickém šoku (Schlosser, 2019). Publikované výsledky se týkaly pouze vlivu MSCs na spektrum exprimovaných cytokinů. V závislosti na dávce podaných MSCs došlo k časnému, avšak přechodnému útlumu produkce některých prozánětlivých cytokinů (IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8, MCP-1); jiné složky nebyly působením MSCs ovlivněny. V rámci hodnocení bezpečnosti a efektivity MSCs podstoupilo v rámci zaslepené placebem kontrolované studie 32 zdravých mužů aplikaci intravenózní dávky LPS po předchozí administraci MSCs derivovaných z tukové tkáně v dávce 0,5 – 4 mil/kg. Aplikace LPS vedla k přechodné klinické odpovědi v podobě febrilie a tachykardie, ke zvýšení exprese více než 8000 genů spojených s akutní odpovědí na přítomnost infekce a k současnému vzestupu hladin prozánětlivých cytokinů. Administrace A-MSCs nevedla k ovlivnění klinického obrazu, současně neovlivnila rozvoj leukocytózy ani koncentraci lipozomálního baktericidního enzymu LL-37. MSCs dále vedly k rozvoji přechodného prokoagulačního stavu a na dávce závislého vzestupu plazmatických nukleozomů spojených v sepsi s procesem apoptózy; na úrovni cytokinů vedly k nadměrné expresi IL-8, IL-10, TGF β a IL-12p40 – jevíly tedy současně pro- i protizánětlivé působení (Perlee, 2018). Bezpečností aplikace MSCs získaných z pupečníku v krátko- i dlouhodobém časovém horizontu se zabývala klinická studie, která zahrnula celkem 15 nemocných v septickém šoku, jimž byly v rozdílných dávkách (ve skupinách po pěti nemocných) transplantovány MSCs. Jednorázová aplikace nevedla k ovlivnění klinických ani laboratorních parametrů včetně ovlivnění ukazatelů zánětlivé odpovědi; nemocní nejevili žádné známky nežádoucích účinků spojených s podáním MSCs. Navzdory malému počtu nemocných, zejména po úmrtí některých pacientů, která snížila počet pod statisticky analyzovatelný, přinesla tato práce jako první náhled na dlouhodobější vliv MSCs – u přeživších nebyly pozorovány žádné nežádoucí účinky po dobu 18 měsíční observace (Xe, 2018).

Neuroinflamatorní reflex a stimulace bloudivého nervu

Relativně nedávno byl prezentován koncept nervové regulace inflamatorní odpovědi, který sjednocuje nervovou a humorální složku kontroly zánětlivé reakce. Neuroinflamatorní reflex je fyziologickým mechanismem integrovaným v rámci nervového systému, který je aktivován prostřednictvím cytokinů či bakteriálních produktů a jeho aktivace vede k regulaci produkce prozánětlivých působků a redukcí míry zánětlivé odpovědi; přerušení drah tohoto mechanismu má za následek excesivní produkci cytokinů (Tracey, 2002, Tracey, 2009, Tracey, 2012). Neuroinflamatorní reflex (také antiinflamatorní anticholinergní cesta) je realizován prostřednictvím bloudivého nervu. Nervová zakončení aferentního ramene reflexního okruhu reagují na přítomnost lipopolysacharidu a cytokinů (zejm. IL-1 β) zvýšenou aktivitou. Aferentní dráhy jsou směřovány v největší porci do nucleus tractus solitarii; četnými spoji pak také do hypotalamu a koncového mozku, kde jsou zodpovědné za vegetativní a behaviorální reakci v nemoci. Eferentní dráhy vedou cestou nervus vagus do ganglion coeliacum, kde aktivují adrenergní neurony sleziny, jež končí v bílé pulpě v blízkosti paměťových T buněk; tyto buňky v odpovědi na adrenergní stimulaci produkují acetylcholin. Sekrece acetylcholinu poté aktivuje podjednotku $\alpha 7$ acetylcholinových receptorů na makrofázích, monocytech, dendritických buňkách a endoteliálních buňkách; tato vazba vede k downregulaci CD14 a TLR-4 exprese na povrchu imunokompetentních buněk a současně aktivuje intracelulární cesty, které potlačují aktivitu NF- κ B a tedy i produkci prozánětlivých cytokinů (Tracey, 2012). Není proto divu, že se vagová stimulace stala jednou z potenciálních léčebných strategií a možností preklinického výzkumu v sepsi. V současné době existuje řada experimentálních prací, které dokládají pozitivní vliv vagové stimulace na přežití, perzistenci orgánových funkcí a míru zánětlivé odpovědi u malých zvířecích modelů sepse. Vliv vagové stimulace na průběh sepse u klinicky relevantního modelu nebyl dosud experimentálně ověřen.

4. CÍLE PŮVODNÍCH VĚDECKÝCH PRACÍ

- 1) Zhodnotit bezpečnostní profil intravenózní aplikace mezenchymálních kmenových buněk klinicky relevantnímu velkému zvířecímu modelu progresivní peritoneální sepse.
- 2) Zhodnotit účinnost aplikace mezenchymálních kmenových buněk modelu progresivní peritoneální sepse; srovnání s dostupnými výsledky a možnosti translace do humánní medicíny.
- 3) Zhodnotit účinnost vagové stimulace u velkého zvířecího modelu progresivní peritoneální sepse.

5. METODICKÉ ASPEKTY PRÁCE

5.1. Legální aspekty experimentů se zvířecím modelem

Všechny experimentální práce byly prováděny v souladu se Směrnicí Evropské Unie pro ochranu zvířat používaných k pokusným nebo jiným vědeckým účelům (86/609/EU). Všechny protokoly byly adekvátně schváleny Odbornou komisí pro práci s experimentálními zvířaty Lékařské fakulty v Plzni, Univerzity Karlovy v Praze a také Ministerstvem školství, mládeže a tělovýchovy. Všechny experimenty byly realizovány v prostorách akreditovaného pracoviště - Laboratoře experimentální intenzivní péče v Biomedicinském centru Lékařské fakulty v Plzni.

5.2. Experimentální model progresivní peritoneální sepse

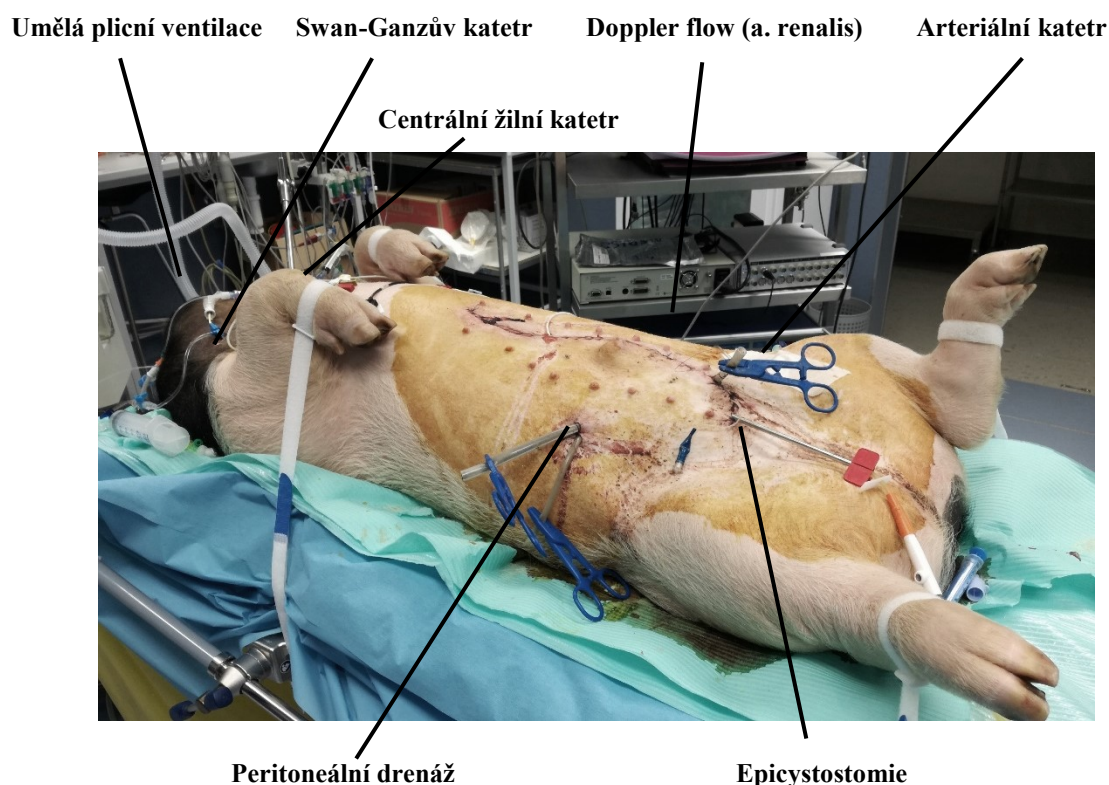
Příprava, anestezie a instrumentace

Selata bez rozdílu pohlaví, o hmotnosti 35 – 55 kg, jsou před vlastním experimentem premedikována intramuskulární aplikací tiletaminu-zolazepamu (Zoletil) v dávce 5mg/kg a xylazinu (Nerfasin) 1mg/kg. Po zavedení kanyly do periferní žíly jsou zvířata uvedena do celkové anestezie intravenózním podáním propofolu 2 % (2 mg/kg) a následně je provedena endotracheální intubace. Zvířata jsou po celou dobu experimentu udržována v totální intravenózní anestezii prostřednictvím kontinuální aplikace 2 % propofolu (20 – 40 mg/10kg/h), analgezie je udržována kontinuálním podáváním fentanylu (5 – 15 µg/kg/h); perioperačně je podáváno myorelaxans rocuronium v dávce 1 mg/kg/h. Uvedené schéma je pro zvíře plně protektivní a šetrné pro experimentální zvíře. Během instrumentace jsou tekutinové ztráty hrazeny kontinuální infúzí balancovaného krystaloidu v dávce 10 ml/kg/h; ten je posléze redukován na 7 ml/kg/h. Zvíře je v průběhu experimentu řízeně objemově ventilováno (inspirační objem 8 – 10 ml/kg, pozitivní end-expirační tlak 6 – 8 cmH₂O, frakce kyslíku 30 %, dechová frekvence se pak pohybuje v rozmezí 20 - 40 dechů/min tak, aby byl arteriální parciální tlak oxidu uhličitého udržován v rozmezí 4,0 – 5,0 kPa).

Vlastní chirurgická příprava zahrnuje zavedení centrálního žilního katetru do levé zevní jugulární žíly za účelem aplikace infuzních roztoků a farmak. Cestou pravé zevní jugulární žíly je zaveden Swan-Ganzův plicnicový katetr za účelem monitorace regionální a systémové hemodynamiky. Kanylace je realizována USG navigovanou procedurou; či v případě neúspěchu otevřenou cestou. Dále je cestou femorální tepny zaveden arteriální

katetr, který umožňuje odběr krevních vzorků a kontinuální monitoraci arteriálního tlaku. Následně je cestou střední laparotomie přistoupeno k protěti Gerotovy fascie a odhalení renální tepny, na níže je nasazena dopplermetrická sonda pro monitoraci průtoku krve. Před uzavřením laparotomie je vyvedena dvouhlavňová ileostomie, která slouží k monitoraci mikrocirkulace střevní sliznice, dále je zavedena epicystostomie k monitoraci výdeje a v dutině břišní jsou ponechány dva drény za účelem indukce peritonitidy a odběru ascitu.

Výše uvedená chirurgická instrumentace nabízí možnost následné extenzivní monitorace makro i mikrohemodynamických změn vyvolaných sepsí na úrovni systémové i regionální (plíce, ledviny) cirkulace, dále umožňuje frekventní odběr vzorků arteriální, venózní i smíšené krve za účelem bedside i laboratorní analýzy; nespornou výhodou je možnost extenzivní post-mortem analýzy tkání.



Obrázek č. 2 – Instrumentace experimentálního zvířecího modelu

Indukce peritonitidy a experimentální protokol

Po vlastní instrumentaci je zvířeti ponechána zpravidla 6 hodinová zotavovací perioda, kterou následuje indukce sterkorální peritonitidy. Ta je realizována aplikací autologní stolice v dávce 1 g/kg intraperitoneálně prostřednictvím zavedených drénů. Stolica je získána od stejného zvířete před zahájením vlastního experimentu; poté je kultivována při teplotě 37 °C ve fyziologickém roztoku (200 ml) po dobu chirurgického výkonu a zotavovací fáze. V průběhu následujících 24 hodin je zvíře léčeno dle aktuálních doporučených postupů s využitím kontinuálního i bolusového podávání krystaloidů či administraci vazoaktivních (noradrenalin) látek. Antibiotika nejsou podávána, pokud není v protokolu uvedeno jinak. Před indukcí a poté, v 6 hodinových intervalech (TP 1-4), je monitorována systémová i regionální hemodynamika a mikrocirkulace střevní sliznice; dále jsou odebírány krevní vzorky k bedside a laboratorní analýze, která zahrnuje základní biochemické parametry, krevní obraz s diferenciálním rozpočtem, parametry koagulace a dále pak parametry zánětlivé odpovědi a míry oxidativního stresu. Léčebné intervence jsou načasovány tak, aby byly zahájeny s odstupem 6 hodin od indukce peritonitidy. Experiment je ukončen 24 hodin po indukci sepse předávkováním anestetiky a odběrem orgánů. V případě progresu do refrakterního septického šoku je pokus ukončen dříve.

Analyzované parametry

SOFA skóre

SOFA skóre bylo hodnoceno na základě doporučení vyplývajících ze SEPSIS-3 definice (Singer, 2016) v každém měřeném intervalu. Skóre bylo redukováno o parametr Glasgow coma scale.

Měření systémových a regionálních hemodynamických parametrů, mikrocirkulace a odvozené výpočty

Měření systémové hemodynamiky zahrnovala snímání srdeční frekvenci (heart rate, HR) a 3 svodové EKG, invazivní kontinuální monitoraci arteriálního tlaku – středního arteriálního tlaku (mean arterial pressure, MAP), dále měření srdečního výdeje (cardiac output, CO), středního arteriálního tlaku v plicnici (mean pulmonary artery pressure, MPAP), dále plnicích tlaků – centrálního žilního tlaku (central venous pressure, CVP) a tlaku v zaklínění plicnice (pulmonary artery wedge pressure, PAWP). Průtok krve ledvinou (Q_{ren}) byl měřen prostřednictvím dopplermetrické sondy nasazené a renální arterii.

Z odvozených parametrů byla hodnocena cévní rezistence – systémová (systemic vascular resistance, SVR) i plicní (pulmonary vascular resistance, PVR); měřené hemodynamické parametry byly dále využity v kalkulaci parametrů utilizace kyslíku (delivery of oxygen, DO₂, oxygen consumption, VO₂ a extraction ratio, ER).

Mikrocirkulace střevní sliznice byla snímána prostřednictvím videomikroskopie (technika SDF, side-stream dark field). Získaný materiál byl zpracován k analýze rozdělením na 3 sekvence zastihující různá místa střevní sliznice a tyto sekvence byly analyzovány prostřednictvím automatizovaného software (Automated Vascular Analysis, AVASoft, MicroVision Medical, Amsterdam, Netherlands).

Laboratorní analýza

Odběr krve z arteriálního a plicnicového katetru byl realizován v 6 hodinových intervalech a umožnil, v kombinaci s hemodynamickými parametry, kalkulaci parametrů utilizace kyslíku (viz výše), dále pak těsnější kontrolu glykémie; v neposlední řadě pak také měření acidobazické rovnováhy (ABR), krevních plynů (a-PO₂, a-PCO₂, pa-PO₂, pa-PCO₂, SvO₂, PaO₂/FiO₂) a koncentraci laktátu.

Základní laboratorní analýza zahrnovala vyšetření krevního obrazu včetně diferenciálního rozpočtu, zhodnocení orgánových funkcí (urea, kreatinin, jaterní enzymy, bilirubin, vysoce senzitivní troponin T), parametry zánětu (C-reaktivní protein a prokalcitonin), sérovou bílkovinu včetně albuminu a parametry koagulace. Rozšiřující laboratorní analýza byla provedena po ukončení projektů a zahrnovala vyšetření základních cytokinů (IL-6, IL-8, TNF α , IL-10) a zhodnocení úrovně oxidativního stresu stanovením sérové koncentrace 8-isoprostanu.

Analýza funkce myocytů a mitochondriální analýza

Myocyty byly izolovány z levé komory myokardu enzymatickým oddělením prostřednictvím kolagenázy A. Sakromerická kontrakce izolovaného kardiomyocytu byla měřena prostřednictvím HyperSwitch Myocyte Calcium and Contractility systému (IonOptix LLC, Westwood, MA, USA).

Funkce mitochondrií izolovaných ze srdeční tkáně byly analyzovány prostřednictvím respirometrie (oxygraf Oroboros O2k, Oroboros Instruments, Innsbruck, Rakousko). Detailní metodika analýzy vzorků je uvedena v publikovaných pracích.

5.3. Experimentální intervence

Mezenchymální kmenové buňky

Allogenní MSCs užívané v experimentu byly izolovány z kostní dřeně (tibií, femur) zdravých zvířat. Tyto buňky byly dále zpracovány dle aktuálních standardů a po dobu projektu zamrazeny v tekutém dusíku. Čtyři týdny před aplikací byly rozmrazeny a kultivovány na nosném médiu. V den transplantace byly buňky sklizeny a suspendovány ve fyziologickém roztoku. Před vlastní aplikací byl prostřednictvím průtokové cytometrie zhodnocen buněčný fenotyp; s odstupem pak byla evaluována schopnost diferenciací v jednotlivé podtypy mezenchymálních tkání. Detailní metodika přípravy MSCs v rámci experimentu je popsána v publikovaném článku.

Vlastní aplikace MSCs experimentálnímu modelu proběhla s odstupem 6 hodin od indukce peritonitidy. Administrace MSCs byla realizována pomalou jednorázovou intravenózní infúzí cestou centrálního žilního katetru. Dávka MSCs byla 1 mil MSCs / kg hmotnosti zvířete.

Vagová stimulace

Stimulaci umožnila stimulační bipolární elektroda, která byla nasazena na levostranný nervus vagus v průběhu chirurgické instrumentace. Vlastní stimulace byla zahájena s odstupem 6 hodin od indukce sepse. N. X byl stimulován impulzy o frekvenci 2 Hz, amplitudě 6 mA a s dobou trvání 2 ms prostřednictvím pulzního generátoru (Isostim, A320, WPI, Sarasota, Florida, USA). Stimulace byla protokolárně upravována dle současné chronotropní odezvy.

6. SOUHRN VÝSLEDKŮ EXPERIMENTÁLNÍCH PRACÍ A DISKUZE

- (IV) **HORÁK, Jan, NALOS, Lukáš, MARTÍNKOVÁ, Vendula, TÉGL, Václav, VIŠTEJNOVÁ, Lucie, KUNCOVÁ, Jitka, KOHOUTOVÁ, Michaela, JARKOVSKÁ, Dagmar, BENEŠ, Jan, ŠTENGL, Milan, MATĚJOVIČ, Martin.** Evaluation of mesenchymal stem cell therapy for sepsis: a randomized controlled porcine study. *Frontiers Immunology* (IF 4,716) under review

V rámci projektu, jehož cílem bylo zhodnotit bezpečnostní profil a efektivitu intravenózní aplikace MSCs velkému, klinicky relevantnímu zvířecímu modelu progresivní peritoneální sepse, bylo randomizováno celkem 32 selat bez významného rozdílu mezi pohlavími a hmotnostmi zvířat do 4 skupin – kontrolní skupina zdravých zvířat (CONTROL, n = 8), zdravá zvířata s aplikovanými MSCs (MSC-CONTROL, n = 8), septická kontrolní zvířata (SEPSIS, n = 8) a intervenovaná septická zvířata (MSC-CONTROL). Pět experimentů bylo předčasně ukončeno pro předčasné úmrtí zvířete před zahájením protokolu, ve dvou případech z důvodu perioperačního úmrtí. Ostatní zvířata dokončila celý 24h protokol.

Intravenózní aplikace suspendovaných MSCs zdravým kontrolním zvířatům byla dobře tolerována. Zvířata nejevila známky akutní toxicity; nedošlo k alteraci cirkulačních parametrů na makro- ani mikrohemodynamické úrovni, zvířata taktéž nerozvinula orgánovou dysfunkci, nedošlo k ovlivnění sledovaných markerů zánětu a míry oxidativního stresu.

Zvířata v obou septických skupinách naplnila kritéria sepse dle SEPSIS-3. Zvířata dále rozvinula typické, sepsí indukované hemodynamické změny charakteristické poklesem vaskulární rezistence a vzestupem srdečního výdeje bez signifikantních rozdílů mezi kontrolní a intervenovanou skupinou. Šest zvířat (75 %) ve skupině SEPSIS a osm zvířat (100 %) ve skupině MSC-SEPSIS potřebovalo vazopresorickou podporu v progresivně navyšované dávce k udržení MAP nad 65 mmHg. Doba potřebná k zahájení farmakologické podpory oběhu byla srovnatelná u obou skupin. Stejně tak nebyl zjištěn signifikantní rozdíl v maximální ani kumulativní dávce noradrenalinu. Aplikace MSCs intervenované skupině nevedla dále ani k redukci vaskulární permeability, kdy kumulativní dávka krystaloidu a sérové hladiny albuminu nebyly rozdílné oproti kontrolní septické

skupině. Na úrovni mikrocirkulace nevedlo podání MSCs k ovlivnění změn vyvolaných sepsí. Sepse vedla k postupnému rozvoji multiorgánové dysfunkce charakterizované progresivně narůstajícím SOFA skóre v průběhu experimentu. Aplikace kmenových buněk nevedla k ovlivnění této progrese; naopak SOFA skóre bylo signifikantně vyšší u intervenované skupiny v čase 18 hodin od indukce vlivem časnějšího, avšak nikoliv významného, zahájení vazopresorické podpory s ohledem na arbitrárně stanovené timepointy. Vliv MSCs na rozvoj orgánové dysfunkce nebyl pozorován ani tehdy, byly-li analyzovány jednotlivé orgány separátně – aplikace MSC nevedla k ovlivnění vzniku a progrese AKI, jaterní dysfunkce, trombocytopenie ani alterace ventilačních funkcí charakterizované poklesem PaO₂/FiO₂. Narůstající sérové hladiny IL-6 a TNFα odrážely postupující sepsi; u intervenované skupiny nebyly tyto hladiny ovlivněny aplikací MSCs. Současně nebyl ovlivněn ani pozorovaný pokles CD14⁺ a CD16⁺ monocytů a Tc, Treg a Th lymfocytů. Míra oxidativního stresu měřená prostřednictvím hladiny 8-isoprostanu nebyla taktéž signifikantně rozdílná. Aplikace MSCs dále neovlivnila dysfunkci kardiomyocytů ani mitochondriální funkce.

Diskuze

Jak již bylo zmíněno dříve, byl příznivý vliv MSCs do nedávné doby popisován pouze v experimentech s malým zvířecím modelem, u něž byla systémová zánětlivá odpověď vyvolána infúzí endotoxinu/LPS nebo byla provedena ligace a punkce céka (cecal ligation-punction, CLP). V rámci výše uvedeného experimentálního projektu byl využit velký zvířecí model progresivní peritoneální sepse, jehož patofyziologie blíže napodobuje procesy v lidské sepsi než malé zvířecí modely (Seok, 2013, Bendixen, 2014), což jej činí vhodnějším pro další translaci získaných výsledků směrem do humánní medicíny. Recentně publikovaná studie aplikace MSCs prasečímu modelu septického šoku přinesla pozitivní výsledky; podání MSCs vedlo k ovlivnění změn hemodynamické alterace indukované sepsí a rozvoje orgánových (ledviny, plíce) dysfunkcí (Laroye, 2018). Výstup z uvedené studie je do určité míry protichůdný oproti výsledkům z námi realizovaného projektu, což může být zapříčiněno řadou faktorů. Anestezie a následný rozsah chirurgické instrumentace zvířete je v konečném důsledku prakticky srovnatelný; rozdílný je však následný management experimentu. Poměrně zásadní se může jevit striktní kontrola teploty zvířete (bazální hodnoty $\pm 1^\circ\text{C}$) oproti nekontrolované tělesné teploty v průběhu námi realizovaného experimentu. Hypertermie je potentním mediátorem hyperdynamické

cirkulace, v úvodních fázích charakterizované zvýšeným srdečním výdejem a poklesem vaskulární rezistence (Walter, 2016). Recipročně s rostoucí teplotou pak dochází k poklesu glomerulární filtrace s následným vzestupem plazmatických hodnot renálních katabolitů (Mustafa, 2007). V neposlední řadě dochází na úrovni myokardu k extravazaci tekutiny s následnou fragmentací myofibril, což se může podílet, spolu s funkčními změnami na subcelulární úrovni, na celkové dysfunkci myokardu (Vlad, 2010). Experiment Laroyové dále vykazuje nižší míru zánětlivé odpovědi (zejména na úrovni IL-6, při srovnatelných či mírně vyšších hladinách TNF α) než tomu bylo u našeho modelu. Rozdílný je také zdroj MSCs, zatímco náš model byl transplantován MSCs derivovanými z kostní dřeně, Laroyová využila MSCs získané z pupečníku. Ty se recentně, na myším modelu CLP-indukované sepse, ukázaly jako potentnější v ovlivnění funkce leukocytů a v procesu imuomodulace oproti buňkám získaných z kostní dřeně (Laroye, 2019). Získávání a zpracování MSCs bylo v případě našeho experimentu adherentní k aktuálně platným doporučením Mezinárodní společnosti pro buněčnou terapii (International Society for Cellular Therapy, ISCT). Jejich potenciál byl testován *in vitro* (viz), nicméně schopnost jejich distribuce a životnost nebyla *in vivo* analyzována. Dávka a způsob podání jsou srovnatelnými s metodikou experimentů, které přinesly pozitivní výsledky.

Nadšení z možnosti využití MSCs jako terapeutické léčebné strategie v sepsi je pochopitelné. Nicméně na druhou stranu je nezbytné kriticky zhodnotit současné postavení MSCs v sepsi. Výsledky získané z experimentálních prací s malým zvířecím modelem jsou zcela jistě opodstatněným důvodem pro další preklinickou experimentální analýzu využití MSCs v sepsi, ale současně naprosto nedostatečné k přenosu výzkumu z modelů hlodavců směrem do humánní medicíny a klinického výzkumu. Výše uvedený experiment je jedním z prvních, které využívají klinicky relevantní model sepse. Rozporné výsledky mezi dosud publikovanými pracemi by měly být impulzem pro další extenzivní zhodnocení nejen efektivity ale i bezpečnosti aplikace kmenových buněk na obdobném modelu, optimálně ve schématu kontrolovaného multicentrického projektu se standardizovaným protokolem, jenž by poskytl data se signifikantně vyšším translačním potenciálem.

(VII) KOHOUTOVÁ, Michaela, HORÁK, Jan, JARKOVSKÁ, Dagmar, MARTÍNKOVÁ, Vendula, TÉGL, Václav, NALOS, Lukáš, VIŠTEJNOVÁ, Lucie, BENEŠ, Jan, ŠVÍGLEROVÁ, Jitka, KUNCOVÁ, Jitka, MATĚJOVIČ, Martin, ŠTENG, Milan. Vagus Nerve Stimulation Attenuates Multiple Organ Dysfunction in Resuscitated Porcine Progressive Sepsis. *Critical Care Medicine*. 2019; 47(6), 461-469. (IF 6,971)

V rámci experimentu bylo randomizováno celkem 25 zvířat od tří skupin – kontrolní skupina (n = 8), septická skupina (n = 8) a septická skupina s vagovou stimulací (n = 9). Všechna zvířata dokončila plánovaný 24h protokol. Septická zvířata, mimo dvou (25 %), naplnila kritéria sepse dle aktuální definice. Před zahájením vagové stimulace nevykazovala zvířata žádné rozdíly napříč sledovanými parametry v septické a intervenované skupině. Stimulovaná zvířata měla v průběhu celého experimentu nižší SOFA skóre než skupina septických zvířat. V rámci separátního zhodnocení jednotlivých kritérií skórovacího systému vedla vagová stimulace k ovlivnění rozvoje poruchy ventilace (hodnocena prostřednictvím PaO₂/FiO₂) a jaterního poškození (nižší hodnoty sérového bilirubinu a transamináz). Incidence AKI byla v obou skupinách stejná, nicméně vagová stimulace měla za následek parciální redukci nárůstu sérového kreatininu. Hodnoty trombocytů zůstaly neovlivněny.

Vagová stimulace vedla k částečnému ovlivnění sepsí indukovaných hemodynamických změn především cestou redukce srdeční frekvence. Celková dávka noradrenalinu byla signifikantně nižší u intervenované skupiny; čas potřebný k zahájení podpory se významně nelišil. Současně zvířata v intervenované skupině potřebovala menší množství resuscitačního krystaloidu navzdory obdobným koncentracím hemoglobinu a plazmatického albuminu. Vagová stimulace taktéž kompletně zabránila poklesu extrakčního poměru kyslíku a vzestupu laktátémie. Mitochondriální analýza prokázala protektivní působení vagové stimulace, kdy nebyla přítomna inhibice mitochondriálního komplexu II a IV. Intervence vedla k prakticky úplnému potlačení sepsí vyvolaných změn na úrovni kardiomyocytů.

Diskuze

Vagová stimulace nebyla dosud testována v rámci velkého zvířecího modelu sepse, proto jsou prezentované výsledky v současné době unikátní v celosvětovém měřítku. Hemodynamické změny navozené stimulací vedly k redukci srdečního výdeje oproti

neintervenované skupině primárně cestou snížení srdeční frekvence. S ohledem na preload a signifikantně nižší potřebu resuscitačního krystaloidu se nabízí hypotetická úvaha směrem k přímému ovlivnění cévní rezistence a/nebo cévní permeability. Tento mechanismus však nebyl dosud popisován. Vagová stimulace taktéž kompletně zabránila vzniku a rozvoji myokardiální dysfunkce. Není jasné, jakým mechanismem je tato protekce zajišťována; z analýzy dat se zdá pravděpodobnou cesta ochrany mitochondrií a zajištění energetického metabolismu kardiomyocytů. Existují experimentální data, která potvrzují benefiční efekt vagové stimulace na činnost myokardu (Schulte, 2014), nicméně žádná z nich nepředstavuje relevantní model septické kardiomyopatie. V přímém kontrastu s aktuálně dostupnou literaturou (Tracey, 2002, Tracey, 2009, Tracey, 2012) je námi zjištěná absence efektu vagové stimulace na hladiny cirkulujících plazmatických cytokinů. Tento náález může poukazovat na významný rozdíl v mechanismech neuroinflamatorního reflexu mezi jednotlivými analyzovanými druhy.

Prvotní povzbudivé výsledky výše uvedeného experimentu by se měly stát východiskem pro další preklinické testování. Rozhodnutí o přesunu výzkumu směrem do humánní medicíny by mělo předcházet především detailnější pochopení mechanismů, které vedou k protektivnímu působení vagové stimulace v sepsi. Současně bude nezbytné extenzivní zhodnocení bezpečnosti a efektivity této metody v podmínkách kritického onemocnění. Stimulace bloudivého nervu však má potenciál proniknout i do klinického výzkumu a to z několika důvodů – 1) Tato metoda již byla schválena jako léčebný postup u některých stavů jako těžká deprese či refrakterní epilepsie. 2) V dosavadní praxi se navíc ukázal jako relativně bezpečná metoda, která nemá zásadní nežádoucí účinky (Yang, 2019). 3) Vagová stimulace prostřednictvím povrchové transkutánní elektrody pak představuje neinvazivní postup s minimálním rizikem pro nemocné.

7. PRÁCE BEZPROSTŘEDNĚ NAVAZUJÍCÍ NA NÁŠ VÝZKUM

(VIII) JARKOVSKÁ, Dagmar, MARKOVÁ, Michaela, HORÁK, Jan, NALOS, Lukáš, BENEŠ, Jan, AL-OBEIDALLAH, Mahmoud, TŮMA, Zdeněk, ŠVÍGLEROVÁ, Jitka, KUNCOVÁ, Jitka, MATĚJOVIČ, Martin, ŠTENGL, Milan. Cellular Mechanisms of Myocardial Depression in Porcine Septic Shock. *Frontiers in Physiology*. 2018; 726(9). (IF 3,476)

Zázemí Biomedicínského Centra umožňuje extenzivní *in vitro*, *in vivo* a *ex vivo* analýzu patofyziologických mechanismů sepse a přidružených orgánových dysfunkcí. Elektrofyzilogická laboratoř Ústavu fyziologie je uznávaným subjektem na poli výzkumu fyziologie srdce. Výše uvedená práce přímo navazuje na preklinický výzkum realizovaný na zvířecím modelu. Obsahem původní experimentální práce je *ex vivo* analýza změn na celulární a subcelulární úrovni, které vedou k rozvoji sepsí vyvolané dysfunkce (septické kardiomyopatie) u modelu progresivní peritoneální sepse.

8. ZÁVĚR

Sepse je jedním z celosvětově nejzávažnějších medicínských problémů, se kterým se potýká moderní medicína. Navzdory nezpochybnitelnému pokroku v oblasti preklinického a klinického výzkumu intenzivní medicíny dosud neexistuje efektivní kauzální léčba, která by postihla patofyziologické mechanismy hned na začátku onemocnění. Minulost opakovaně ukázala, že mnohé léčebné strategie, které přinesly pozitivní výsledky ve smyslu ovlivnění průběhu sepse, testované na malých zvířecích modelech, prakticky nikdy nepronikly do klinické praxe a snaha o jejich přenos do humánní medicíny se téměř vždy roztříštila o komplexnost a heterogenitu procesů lidské sepse.

Populace, ve své podstatě inbredních malých zvířecích modelů, u nichž neexistují žádné komorbidity, spolu s uniformitou jejich patofyziologické odpovědi na infekční inzult, ani vzdáleně nekopírují populaci kriticky nemocných pacientů, kteří jsou hospitalizováni na jednotkách intenzivní péče po celém světě. Testování léčebných strategií na velkém zvířecím modelu tvoří skupinu metod, které umožňují překlenout tuto mezeru mezi preklinickým a klinickým výzkumem. Vmezeřením uvedené metodiky do procesu testování, optimálně v podobě multicentrických projektů se standardizovaným protokolem a standardizovanou technikou, současně s vývojem a integrací velkého zvířecího modelu s chronickými orgánovými dysfunkcemi, jenž by umožnil detailní modelování a analýzu procesů kriticky nemocných, by byla v budoucnu možná extrakce výsledků s vysokým translačním potenciálem a silnou prediktivní hodnotou.

9. PODPORA

Experimentální projekty jsou nezávislé na komerčních subjektech. Práce byla podpořena Programem rozvoje vědních oborů UK (Progres Q39), grantem AZV (projekt 15-32801A) a projektem CZ.02.1.01/0.0/0.0/16_019/0000787 “Fighting Infectious Diseases”, oceněným MEYS CR, financovaným z EFRR.

10. PODĚKOVÁNÍ

Dizertační práce byla vytvořena v rámci doktorského studia v oboru Vnitřní lékařství, Lékařské fakulty v Plzni Univerzity Karlovy v Praze.

Chtěl bych zde vyjádřit své poděkování...

... mému školiteli, **prof. MUDr. Martinu Matějovičovi, Ph.D.** za příležitost, za jeho profesní přístup, trpělivost a nepochybně častou shovívavost, a hlavně za jeho motivaci a mentorství jak ve vědecké, tak v klinické praxi.

... mým **kolegům z Biomedicínského Centra**, díky nimž bylo možné veškerý výzkum realizovat, a díky kterým nebyly náročné začátky tak frustrující.

... mým **kolegům z Metabolického JIPu** za podporu, shovívavost a přátelství.

... své **rodině** za nekonečnou podporu, lásku a dobře myšlené a pravdivé, ale málokdy vyslyšené profesní i životní rady; v tiché vzpomínce také svému dědečkovi, jenž byl mým vzorem disciplíny, pečlivosti a trpělivosti.

... konečně své **partnerce**, za ohromnou porci lásky, podpory, trpělivosti a tolerance.

11. LITERATURA

- ALLAM, R, SCHERBAUM, CR, DARISIPUDI, MN, MULAY, SR, HAGELE, H, LICHTNEKERT, J, et al. Histones from dying renal cells aggravate kidney injury via TLR2 and TLR4. *J Am Soc Nephrol*. 2012; 23(8),1375–88.
- BENDIXEN, E. Animal models for translational proteomics. *Prot Clin Appl*. 2014; 8, 637–639.
- BRUDECKI, L, FERGUSON, DA, MCCALL, CE, EL GAZZAR, M. Myeloid-derived sup-pressor cells evolve during sepsis and can enhance or attenuate the systemic inflammatory response. *Infect Immun*. 2012; 80(6), 2026–34.
- CALVANO, SE, et al. A network-based analysis of systemic inflammation in humans. *Nature*. 2005; 437, 1032–1037.
- DE BACKER, D, CRETEUR, J, PREISER, JC, DUBOIS, MJ, VINCENT, JL. Microvascular blood flow is altered in patients with sepsis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 2002; 166(1), 98–104.
- DEUTSCHMAN, CS, TRACEY, KJ. Sepsis: current dogma and new perspectives. *Immunity*. 2014; 40(4), 463–475.
- GAROFALO, AM, LORENTE-ROS, M, GONCALVEZ, G, CARRIEDO, D, BALLÉN-BARRAGÁN, A, VILLAR-FERNÁNDEZ, A, LORENTE, JA. Histopathological changes of organ dysfunction in sepsis. *Intensive Care Medicine Experimental*. 2019; 7(1), 45.
- GENTILE, LF, CUENCA, AG, EFRON, PA, ANG, D, BIHORAC, A, MCKINLEY, BA, et al. Persistent inflammation and immunosuppression: a common syndrome and new horizon for surgical intensive care. *J Trauma Acute Care Surg*. 2012; 72(6), 1491–501.
- GOMEZ, H, INCE, C, DE BACKER, D, PICKKERS, P, PAYEN, D, HOTCHKISS, J, KELLUM, JA. A unified theory of sepsis-induced acute kidney injury: inflammation, microcirculatory dysfunction, bioenergetics, and the tubular cell adaptation to injury. *Shock*. 2014; 41(1), 3-11.
- GOTO, T, YOSHIDA, K, TSUGAWA, Y, et al. Infectious Disease-Related Emergency Department Visits of Elderly Adults in the United States, 2011–2012. *Journal of American Geriatric Society*. 2016; 64(1), 31–36.

GOTTS, JE, MATTHAY, MA. Sepsis: Pathophysiology and clinical management. *BMJ*, 2016; 353.

GUERCI, P, ERGIN, B, INCE, C. The macro- and microcirculation of the kidney. *Best Practice and Research: Clinical Anaesthesiology*. 2017; 31(3), 315–329.

HASSOUN, HT, GRIGORYEV, DN, LIE, ML, LIU, M, CHEADLE, C, TUDER, RM, et al. Ischemic acute kidney injury induces a distant organ functional and genomic response distinguishable from bilateral nephrectomy. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2007; 293(1), 30–40.

HAWKINS, RB, RAYMOND, SL, STORTZ, JA, HORIGUCHI, H, BRAKENRIDGE, SC, GARDNER, A, MOLDAWER, LL. Chronic Critical Illness and the Persistent Inflammation, Immunosuppression, and Catabolism Syndrome. *Frontiers in Immunology*. 2018; 9, 1511.

HE, X, AI, S, GUO, W, YANG, Y, WANG, Z, JIANG, D, XU, X. Umbilical cord-derived mesenchymal stem (stromal) cells for treatment of severe sepsis: a phase 1 clinical trial. *Translational Research*, 2018; 199, 52–61.

HOKE, TS, DOUGLAS, IS, KLEIN, CL, HE, Z, FANG, W, THURMAN, JM, et al. Acute renal failure after bilateral nephrectomy is associated with cytokine-mediated pulmonary injury. *J Am Soc Nephrol*. 2007; 18(1), 155–64.

KELLUM, JA, RONCO, C, VINCENT, JL. Controversies in Acute Kidney Injury. *Contrib Nephrol*. 2011; 174, 89–97.

KELLUM, JA, BELLOMO, R, RONCO, C. Kidney attack. *JAMA*. 2012; 307(21), 2265–2266.

KELLUM, JA, PROWLE, JR. Paradigms of acute kidney injury in the intensive care setting. *Nature Reviews Nephrology*, 2018; 14(4), 217–230.

LAMAS, D. Chronic critical illness. *New England Journal of Medicine*. 2014; 370, 175–177.

LAROYE, C, LEMARIE, J, BOUFENZER, A, LABROCA, P, CUNAT, L, ALAUZET, C, GIBOT, S. Clinical-grade mesenchymal stem cells derived from umbilical cord improve septic shock in pigs. *Intensive Care Medicine Experimental*. 2018; 6(1), 24.

- LAROYE, C, BOUFENZER, A, JOLLY, L, CUNAT, L, ALAUZET, C, MERLIN, JL, GIBOT, S. Bone marrow vs Wharton's jelly mesenchymal stem cells in experimental sepsis: a comparative study. *Stem Cell Research & Therapy*. 2019; 10(1), 1–11.
- LIU, V, ESCOBAR, GJ, GREENE, JD, et al. Hospital deaths in patients with sepsis from 2 independent cohorts. *Journal of American Medical Association (JAMA)*. 2014; 312(1), 90–92.
- LOFTUS, TJ, MOHR, AM, MOLDAWER, LL. Dysregulated myelopoiesis and hematopoietic function following acute physiologic insult. *Curr Opin Hematol*. 2018; 25(1), 37–43.
- MATĚJOVIČ, M, CHVOJKA, J, RADĚJ, J, LEDVINOVÁ, L, KARVUNIDIS, T, KROUŽECKÝ, A, NOVÁK, I. Sepsis and acute kidney injury are bidirectional. *Contributions to Nephrology*. 2011; 174, 78–88.
- MATĚJOVIČ, M. Ledviny v sepsi. IN: PRŮCHA, M, FEDORA, M, KIESLICOVÁ, E, ŠRÁMEK, V, et al. *Sepse*. 1. vydání. Praha: Maxdorf. 2015, s. 136-149. ISBN 978-80-7345-448-7.
- MUSTAFA, S, ELGAZZAR, AH, ESSAM, H, GOPINATH, S, MATHEW, M. Hyperthermia alters kidney function and renal scintigraphy. *Am J Nephrol*. 2007; 27(3), 315-21.
- PERLEE, D, VAN VUGHT, LA, SCICLUNA, BP, MAAG, A, LUTTER, R, KEMPER, EM, VAN DER POLL, T. Intravenous Infusion of Human Adipose Mesenchymal Stem Cells Modifies the Host Response to Lipopolysaccharide in Humans: A Randomized, Single-Blind, Parallel Group, Placebo Controlled Trial. *Stem Cells*. 2018; 36(11), 1778–1788.
- PICKKERS, P, MEHTA, RL, MURRAY, PT, JOANNIDIS, M, MOLITORIS, BA, KELLUM, JA, AREND, J. Effect of Human Recombinant Alkaline Phosphatase on 7-Day Creatinine Clearance in Patients With Sepsis-Associated Acute Kidney Injury: A Randomized Clinical Trial. *JAMA*. 2019; 320(19), 1998–2009.
- POOL, R, GOMEZ, H, KELLUM, JA. Mechanisms of Organ Dysfunction in Sepsis. *Critical Care Clinics*. 2018; 34(1), 63–80.

SEOK, J, WARREN, HS, CUENCA, AG, MINDRINOS, MN, BAKER, HV, XU, W, RICHARDS, DR, MCDONALD-SMITH, GP, GAO, H, HENNESSY, L, FINNERTY, CC, LOPEZ, CM, HONARI, S, MOORE, EE, MINEI, JP, CUSCHIERI, J, BANKEY, PE, JOHNSON, JL, SPERRY, J, NATHENS, AB, BILLIAR, TR, WEST, MA, JESCHKE, MG, KLEIN, MB, GAMELLI, RL, GIBRAN, NS, BROWNSTEIN, BH, MILLER-GRAZIANO, C, CALVANO, SE, MASON, PH, COBB, JP, RAHME, LG, LOWRY, SF, MAIER, RV, MOLDAWER, LL, HERNDON, DN, DAVIS, RW, XIAO, W, TOMPKINS, RG. Genomic responses in mouse models poorly mimic human inflammatory diseases. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2013; 110, 3507–3512.

SINGER, M. The role of mitochondrial dysfunction in sepsis-induced multi-organ failure. *Virulence*. 2014; 5(1), 66–72.

SINGER, M, et al. The third international consensus definitions for sepsis and septic shock (sepsis-3). *JAMA*. 2016; 315(8), 801–810.

SINGER, M. Critical illness and flat batteries. *Critical care*. 2017; 21(3), 309.

SCHLOSSER, K, WANG, JP, DOS SANTOS, C, WALLEY, KR, MARSHALL, J, FERGUSON, DA, MEI, SHJ. Effects of Mesenchymal Stem Cell Treatment on Systemic Cytokine Levels in a Phase 1 Dose Escalation Safety Trial of Septic Shock Patients. *Critical Care Medicine*. 2019; 47(7), 918–925.

SCHULTE, W, BERNHAGEN, J, BUCALA, R. Cytokines in sepsis: potent immunoregulators and potential therapeutic targets--an updated view. *Mediators of Inflammation*. 2013; 165974.

SCHULTE, A, LICHTENSTERN, C, HENRICH, M, WEIGAND, MA, UHLE, F. Loss of vagal tone aggravates systemic inflammation and cardiac impairment in endotoxemic rats. *The Journal of Surgical Research*. 2014; 188(2), 480–488.

TRACEY, KJ. The inflammatory reflex. *Nature*. 2002; 420, 853–859.

TRACEY, KJ. Reflex control of immunity. *Nat Rev Immunol*. 2009; 9, 418–428.

TRACEY, KJ. The vagus nerve and the inflammatory reflex--linking immunity and metabolism. *Nature Reviews. Endocrinology*. 2012; 8(12), 743–754.

TRIVERIO, PA, et al. Long-term prognosis after acute kidney injury requiring renal replacement therapy. *Nephrol Dial Transplant*. 2009, 24, s. 2186–2189.

VINCENT, JL, et al. Sepsis in European intensive care units: results of the SOAP study. *Crit Care Med.* 2006, 34, s. 344–353.

VLAD, M, IONESCU, N, ISPAS, AT, GIUVĂRĂȘTEANU, I, UNGUREANU, E, STOICA, C. Morphological changes during acute experimental short-term hyperthermia. *Rom J Morphol Embryol.* 2010; 51(4), 739-44.

WALTER, EJ, HANNA-JUMMA, S, CARRARETTO, M, FORNI, L. The pathophysiological basis and consequences of fever. *Critical Care.* 2016; 20(1), 1–10.

YANG, J, Phi, JH.. The Present and Future of Vagus Nerve Stimulation. *Journal of Korean Neurosurgical Society.* 2019; 62(3), 344–352.

ZAGER, RA, JOHNSON, AC, LUND, S, HANSON, S. Acute renal failure: determinants and characteristics of the injury-induced hyperinflammatory response. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2006; 291(3), 546–56.

12. Přílohy